

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-189701

(43) 公開日 平成9年(1997)7月22日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 9 3		G 0 1 N 33/543	5 9 3
5/02			5/02	A
33/531			33/531	B
33/553			33/553	

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平8-346799	(71) 出願人	390037969 ベーリングヴェルケ・アクチエンゲゼル シャフト BEHRINGWERKE AKTIEN GESELLSCHAFT ドイツ連邦共和国マルブルク/ラーン (番地なし)
(22) 出願日	平成8年(1996)12月26日	(72) 発明者	アンドレーアス・ヴィーガント ドイツ連邦共和国34641シュヴァルムシュ タト、トライゼルシュトラッセ15
(31) 優先権主張番号	1 9 5 4 8 3 7 6 : 6	(74) 代理人	弁理士 高木 千嘉 (外2名)
(32) 優先日	1995年12月27日		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 質量感受性バイオセンサー

## (57) 【要約】

【課題】 診断および分析方法に使用する、特に診断的に関連する特異的結合パートナーの免疫化学的検出方法の提供。

【解決手段】 生物学的流体の試料中の被分析物質の免疫化学的検出方法であって、第一の特異的結合パートナーが圧電センサーである固相に直接結合しており、そして使用するセンサーの表面が測定後適当な溶媒を使用する処理により固相が再生されることができるようコートされていることを特徴とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的流体の試料中の被分析物質の免疫化学的検出方法であって、第一の特異的結合パートナーが圧電センサーである固相に直接結合しており、そして使用するセンサーの測定表面が測定後適当な溶媒を使用する処理により固相が再生されることができるようコートされている前記方法。

【請求項2】 固相が貴金属好ましくは金でコートされている請求項1記載の方法。

【請求項3】 第一の特異的結合パートナーが免疫グロブリン又は免疫グロブリンの断片である請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 固相が、反応が起こった後第一の特異的結合パートナーを試薬により固相から分離することにより再生される請求項1～3の少なくとも一項記載の方法。

【請求項5】 試薬が還元剤を含有する請求項4記載の方法。

【請求項6】 試薬が酸化剤を含有する請求項4記載の方法。

【請求項7】 試薬が $\text{NaBH}_4$ を含有する請求項4記載の方法。

【請求項8】 試薬がテトラブチルアンモニウムヒドロキシドを含有する請求項4記載の方法。

【請求項9】 請求項1記載の方法において、貴金属からなる再生可能な固相の使用。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は診断及び分析の過程において、特に診断に関連する特異的結合パートナーの免疫化学的検出のために使用する圧電センサーに関する。圧電センサー自体は例えばDickert等の記述(Chemie in unserer Zeit (今日の化学) (1994年), 28巻(3号), 147～152ページ)から既知である。そのようなバイオセンサーは例えば米国特許第4,236,893号及び4,735,906号にも記述されている。

【0002】診断的に関連する分子(被分析物質)の検出に使用することができるようバイオセンサーは、一般に検出される分子に特異的な結合パートナーでコートされており、それによりこれらの分子を選択的に結合することができる表面を持つ変換器からなる。圧電石英結晶が通常変換器として使用される。石英結晶が対応する電子回路に組み込まれると、それは特定の共振周波数で共振する。そこで検出される分子が蓄積されると、共振周波数は変化する。そのような電子回路は例えばDE-A 39 20 052の記述から当業者に知られている。

【0003】これらの既知のバイオセンサーは既に上に述べた目的を部分的には達成している。しかしながら、使用される方法例えば抗体がシラン誘導体により石英表面に結合される方法の場合、一方で、抗体を石英表面に

結合する方法は極めて手がかかり且つ再現性に乏しく、他方、検出される抗原と抗体との間の結合を破壊し、そして結合した抗原を分離する意図で反応物溶液で処理することによりセンサー表面を再使用可能にするための方法はそれ自体再現性に乏しく、そしてセンサー表面上で抗体の抑制されない破壊という結果になることが分かっている。

【0004】Davis等の報告書(Anal. Chem. (1989年), 61巻(11号), 1227～1230ページ)は変換器に金をコートし、この層にプロテインAを結合することが可能であると説明している。これにより、プロテインAは診断的に関連する分子の検出のため抗体と可逆的に結合することができる。著者自身が説明しているように、プロテインAコーティングはシグナルを強く変更し、測定を全部にわたって妨害する。

従って、本発明の目的は特異的結合パートナーでコートすることが簡単であり、同時に特異的反応が起こった後簡単に信頼性をもって再生することができる分析及び診断の過程に使用するバイオセンサーを提案することである。

【0005】本発明により、この目的はセンサーを貴金属好ましくは金でコートし、そして特異的結合パートナーをこのコーティングに結合しうることによって達成される。特異的結合パートナーはこのようにコートしたバイオセンサーから、例えばDE 44 36 910に開示された試薬を使用して分離することができる。

【0006】変換器の態様又は被分析物質の蓄積による変化が測定シグナルに変換される仕方は本発明にとって本質的なことではない。本発明は二つの手動の方法、例えばセンサーを試料に浸漬する方法、及び自動分析器による方法に使用することができる。

【0007】原則として、本発明の方法は次のように実行することができる。すなわち、適当な電子回路(例えばSensotec社が販売する)に組み込まれた市販の金をコートした圧電結晶に測定する被分析物質に特異的な結合パートナーをコートする。そのような特異的結合パートナーは、例えばモノクローナル又はポリクローナル抗体又は抗体断片、レクチン又は抗原でよい。コーティング時間は5分～数時間、好ましくは10～120分である。コーティング後、センサー表面を洗浄用緩衝液で洗いますぐ。洗浄用緩衝液は好ましくは洗浄剤を含有する。この特異的コーティングには、非特異的結合を防ぐため、場合により、さらに非特異的コーティング例えばBSA又は不活性化PODをコートしてよい。このような方法はそれ自体当業者に既知である。洗浄操作はそのような非特異的コーティングの後に行ってもよい。

【0008】コートしたセンサーは試料と一緒にインキュベートするが、これは例えば試料に浸漬するか又はセンサー表面に塗布して実行することが可能である。さらに別の有利な実施態様は測定を連続的流動条件下で実行

3

しうようにセンサー表面が設計されているのである。それぞれのセンサーについてその適用に対してどの設計にすべきかの決定は当業者にとって容易なことである。

【0009】被分析物質が特異的結合パートナーと反応した結果である測定される量例えば共振周波数は電子回路を変更することにより測定される。結合した被分析物質の量は、例えば参照曲線との対比により得られる測定される量の変化から導き出すことができる。この手順は集団単位で直接測定するためにも適している。測定される量の変化を求めるため、例えば特異的結合パートナーでコートされていない参照電極を使用することができる。試料とのインキュベーション終了後、さらに洗浄操作を置くのが好都合である。試料とのインキュベーションは1~100分、特に5~60分間実行するのが有利であり、そして10~30分がもっとも有利である。

【0010】再生はDE 44 36 910に記述されているように実行することができる。固相として貴金属特に金を使用する場合のこの操作は、特定の還元剤又は酸化剤例えば水素化ホウ素ナトリウム又はテトラブチルアンモニウムヒドロキシドを固相として、洗浄剤を添加するか又はしないかで再生のために使用する。次の例証的具体例は本発明を説明するためであって、それに何らの制限を加えようとするものではない。

#### 【0011】実施例

##### ヒトIgEの定量的測定

支持体：テフロン環（外径36mm）の中にはめこんだSensotec社から入手の金をコートした圧電結晶。金表面直径：9mm、金表面積：14mm<sup>2</sup>。

コーティング：抗ヒトIgE（ウサギ）ポリクローナル抗体の50μlをセンサーに塗布する。抗体濃度は5μg/mlである。この溶液はその他にリン酸ナトリウム75mM、NaCl 75mM、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100g/lを含有する。pHは6.0である。抗体溶液は37℃で1時間又は室温で一晩静置する。

洗浄段階：上清を除き、センサーをそれぞれ250μlの洗浄用緩衝液で5回洗います。この洗浄用緩衝液はトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（TRIS）50mM及びクエン酸50mMからなるpH7.4の溶液である。

【0012】後続するコーティング：不活性化したペル

4

オキシダーゼ（POD）50μlをセンサーに塗布する。POD濃度は1g/lである。この溶液はその他にリン酸ナトリウム75mM、NaCl 75mM、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100g/lを含有する。pHは6.0である。POD溶液は37℃で1時間又は室温で一晩静置する。

洗浄段階：上清を除き、センサーをそれぞれ250μlの洗浄用緩衝液で5回洗います。この洗浄用緩衝液はトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（TRIS）50mM及びクエン酸50mMからなるpH7.4の溶液である。

【0013】試料のインキュベーション：所定量のIgEを含有するヒト血清50μlをセンサーに塗布し、37℃で30分間インキュベートする。

洗浄段階：上清を除き、センサーをそれぞれ250μlの洗浄用緩衝液（リン酸ナトリウム5mM、NaCl 85mM、ツイーン201g/l、フェノール0.5g/l、pH6.5）で5回洗います。

【0014】固相の再生：20重量%テトラブチルアンモニウムヒドロキシド溶液250μlをセンサーに塗布し、37℃で1時間インキュベートする。

洗浄段階：上清を除いた後、センサーを脱イオン水で5回洗います。

【0015】2回目の再生：1重量%NaBH<sub>4</sub>溶液250μlをセンサー上で、室温で15分間インキュベートする。この溶液はその他に2-（シクロヘキサミノ）エタンスルホン酸（CHES）50mMを含有する。pHは10.0である。

洗浄段階：上清を除いた後、センサーを脱イオン水で3回そしてリン酸緩衝生理食塩水（pH7.2）で3回洗います。

#### 【0016】結果<sup>1)</sup>：

1. 100IU/mlのヒトIgEの測定=829aU<sup>2)</sup>
2. 100IU/mlのヒトIgEの測定=576aU
3. 100IU/mlのヒトIgEの測定=623aU
4. 0IU/mlのヒトIgEの測定=19aU
5. 100IU/mlのヒトIgEの測定=767aU
6. 100IU/mlのヒトIgEの測定（対照=非特異的コーティング抗体）=14aU

1) n=2の平均

2) 任意の単位

フロントページの続き

(72)発明者 ノルベルト・マドリー  
ドイツ連邦共和国35041マルブルク、ヘー  
エンヴェーク68

(72)発明者 カルステン・シエルプ  
ドイツ連邦共和国35041マルブルク、リン  
デンヴェーク39

(72)発明者    パウル・メラー  
                 ドイツ連邦共和国35041マルブルク、ヴェ  
                 ーアアカー 4

(72)発明者    ミヒヤエル・マーレン  
                 ドイツ連邦共和国35041ヴェーアスハウゼ  
                 ン、ツム・ブファフエンゲルト 7

Best Available Copy